

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-51775

(P2002-51775A)

(43) 公開日 平成14年2月19日 (2002.2.19)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テームト* (参考) |
|-----------------------------------|------|---------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 | | C 1 2 P 21/02 | C 2 G 0 4 5 |
| 5/10 | | C 1 2 Q 1/02 | 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 P 21/02 | | G 0 1 N 33/15 | Z 4 B 0 6 3 |
| C 1 2 Q 1/02 | | 33/48 | P 4 B 0 6 4 |
| G 0 1 N 33/15 | | 33/50 | Z 4 B 0 6 5 |
| 審査請求 有 請求項の数29 O L (全 8 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願2001-111210 (P2001-111210)

(22) 出願日 平成13年4月10日 (2001.4.10)

(31) 優先権主張番号 特願2000-165150 (P2000-165150)

(32) 優先日 平成12年6月1日 (2000.6.1)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年12月7日～
10日 開催の「第22回日本分子生物学会年会」において
文書をもって発表

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 岡野 栄之

東京都文京区本駒込6-13-15 メゾン・
ド・ジャルダン104号室

(72) 発明者 澤本 和延

大阪府高槻市日吉台四番町20-32

(72) 発明者 小林 和人

福島県福島市蓬萊町7丁目10番地2-3 D

(74) 代理人 100093230

弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法

(57) 【要約】

【課題】 多種多様な細胞によって構成されている細胞
集団から、ドーパミン作動性ニューロンを高い割合で濃
縮し、分離する方法を提供する。

【解決手段】 細胞集団から、ドーパミン作動性ニュー
ロンを分離する方法であって、ドーパミン作動性ニュー
ロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの
制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子
を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光
を発する細胞を分離する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞集団から、ドーパミン作動性ニューロンを分離する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光を発する細胞を分離することを特徴とするドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法。

【請求項2】 ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンハイドロキシラーゼ遺伝子である請求項1の方法。

【請求項3】 蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質である請求項1の方法。

【請求項4】 細胞集団の各細胞が、脳由来である請求項1の方法。

【請求項5】 細胞集団の各細胞が、ES細胞由来である請求項1の方法。

【請求項6】 細胞集団の各細胞が、骨髄間質細胞由来である請求項1の方法。

【請求項7】 細胞集団の各細胞が、ヒト由来である請求項1、4、5または6の方法。

【請求項8】 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞である請求項1から7のいずれかの方法。

【請求項9】 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来である請求項1から6のいずれかの方法。

【請求項10】 蛍光を発する細胞を、セルソーターを用いて濃縮・分離する請求項1から9のいずれかの方法。

【請求項11】 請求項1から10のいずれかの方法により濃縮・分離され、培養条件下に保持された細胞。

【請求項12】 細胞集団に存在するドーパミン作動性ニューロンを生きたまま同定する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団の蛍光分布を測定することを特徴とするドーパミン作動性ニューロンの同定方法。

【請求項13】 ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンハイドロキシラーゼ遺伝子である請求項12の方法。

【請求項14】 蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質である請求項12の方法。

【請求項15】 細胞集団の各細胞が、脳由来である請求項12の方法。

【請求項16】 細胞集団の各細胞が、ES細胞由来である請求項12の方法。

【請求項17】 細胞集団の各細胞が、骨髄間質細胞由来である請求項12の方法。

【請求項18】 細胞集団の各細胞が、ヒト由来である請求項12、15、16または17の方法。

【請求項19】 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞である請求項12から18のいずれかの方法。

【請求項20】 細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来である請求項12から17のいずれかの方法。

【請求項21】 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞をドーパミン作動性ニューロンへと誘導する因子を同定する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞に導入し、この細胞と候補物質とを共存させ、細胞の蛍光を指標として候補物質がドーパミン作動性ニューロン誘導因子か否かを決定するドーパミン作動性ニューロン誘導因子の同定方法。

【請求項22】 ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンハイドロキシラーゼ遺伝子である請求項21の方法。

【請求項23】 蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質である請求項21の方法。

【請求項24】 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、神経幹細胞である請求項21の方法。

【請求項25】 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ES細胞である請求項21の方法。

【請求項26】 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、骨髄間質細胞である請求項21の方法。

【請求項27】 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ヒト由来である請求項21、24、25または26の方法。

【請求項28】 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞である請求項21から27のいずれかの方法。

【請求項29】 ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来である請求項21から26のいずれかの方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、ドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法に関するものである。さらに詳しくは、パーキンソン病等の治療のための移植細胞として、またそれら疾患の治療法開発のための研究材料として有用なドーパミン作動性ニューロンを同定し、効率よく確実に濃縮し分離する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】パーキンソン病は、中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンが選択的に変性脱落することによって発症する疾患である。その治療には、ドーパミン作動性ニューロン（またはドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞）を多く含む胎児中脳組織を患者の脳内（線条体）に移植することの有効性が証明されている。

【0003】しかしながら、通常の臨床使用に十分な量の胎児脳組織を確保することは、実際上は不可能である。このため、胎児中脳に替わるドナー細胞が求められている。

【0004】例えば、多数の未分化な神経系細胞からドーパミン作動性ニューロンへと分化した細胞を移植用のドナー細胞として使用することが検討されている。さらに、ES細胞や骨髄間質細胞などの非神経系細胞からドーパミン作動性ニューロンへと分化させた細胞を移植用のドナー細胞として使用することも検討されている。これらの細胞は試験管内で増殖させた後に分化誘導することができるので、ドナー不足の問題を解決する手段となりうる。さらに、骨髄間質細胞は成人から安全に採取することが可能であるため、患者自身の細胞から移植用のドーパミン作動性ニューロンを調製することが可能である。従って、このような治療方法が実現すれば、ドナー不足の問題や拒絶反応等の技術的な問題が解決されるだけでなく、ドーパミン作動性ニューロンを中絶胎児から得ることによる倫理的な問題も解決される。

【0005】しかしながら、未分化な細胞集団からドーパミン作動性ニューロンを効率よく分化させる方法は十分に確立されていない。また、未分化な細胞集団からは、ドーパミン作動性ニューロン以外の各種細胞が分化する。さらに、未分化な細胞集団の中には移植後に腫瘍を形成する細胞が含まれている危険性がある。従って、試験管内で分化させたドーパミン作動性ニューロンを移植用に用いるためには、多種類の細胞集団からドーパミン作動性ニューロンを選択的に分離する必要がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】前記のとおり、濃縮されたドーパミン作動性ニューロンは、パーキンソン病等の治療用の移植ドナー細胞としての有用性が期待されている。また、ドーパミン作動性ニューロンを濃縮・分離することは、このニューロンで特異的に発現する新規タンパク質や遺伝子の同定にも極めて有用である。これらのタンパク質やその遺伝子は新規の治療薬が期待されるからである。

【0007】また、未分化な細胞からドーパミン作動性ニューロンを試験管内で分化させる因子を同定することは極めて重要である。そのような因子は、未分化な細胞からドーパミン作動性ニューロンを効率よく誘導するために役立つだけでなく、その因子そのものが新規の治療薬となりうるが期待されるからである。

【0008】しかしながら、ドーパミン作動性ニューロンを生体組織または培養条件下の細胞集団から分離する方法は未だ確立されていない。さらに、ドーパミン作動性ニューロンを試験管内で誘導する因子を探索する方法は勿論のこと、そのような探索に必要なドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化する方法も未だ確立されていない。

【0009】この出願の発明は、多種多様な細胞によって構成されている細胞集団の中のドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化し、そのドーパミン作動性ニューロンを高い割合で濃縮し、分離する方法を提供することを課題としている。

【0010】また、この出願の発明は、その方法によって分離されたドーパミン作動性ニューロンを提供することも課題としている。さらにこの出願の発明は、未分化な細胞をドーパミン作動性ニューロンへと分化誘導する因子を特定する方法を提供することを課題としてもいる。

【0011】

【課題を解決するための手段】この出願は、第1の発明として、細胞集団から、ドーパミン作動性ニューロンを分離する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光を発する細胞を分離することを特徴とするドーパミン作動性ニューロンの濃縮・分離方法を提供する。

【0012】この出願はまた、第2の発明として、前記第1発明の方法により濃縮・分離され、培養条件下に保持された細胞を提供する。またこの出願は、第3の発明として、細胞集団に存在するドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化、同定する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団の蛍光分布を測定することを特徴とするドーパミン作動性ニューロンの同定方法を提供する。

【0013】さらにこの出願は、第4の発明として、ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞をドーパミン作動性ニューロンへと誘導する因子を同定する方法であって、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を細胞に導入し、この細胞と候補物質とを共存させ、細胞の蛍光を指標として候補物質がドーパミン作動性ニューロン誘導因子か否かを決定するドーパミン作動性ニューロン誘導因子の同定方法を提供する。

【0014】前記第1および第3の各発明方法においては、以下を好ましい態様としている。ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンヒドロキシ

ラーゼ遺伝子であること。

【0015】蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質であること。細胞集団の各細胞が、脳由来であること。細胞集団の各細胞が、ES細胞であること。

【0016】細胞集団の各細胞が、骨髄間質細胞由来であること。細胞集団の各細胞が、ヒト由来であること。細胞集団の各細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞であること。

【0017】細胞集団が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来であること。また、前記第1発明においては、蛍光を発する細胞を、セルソーターを用いて濃縮・分離することを好ましい態様としている。

【0018】さらに、前記第3発明においては、以下を好ましい態様としている。ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子が、チロシンハイドロキシラーゼ遺伝子であること。

【0019】蛍光タンパク質が、グリーン蛍光タンパク質であること。ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、神経幹細胞であること。

【0020】ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ES細胞であること。ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、骨髄間質細胞であること。

【0021】ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、ヒト由来であること。ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を保有する組換えベクターを導入された細胞であること。

【0022】ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞が、レポーター核酸分子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生させた動物またはその子孫動物由来であること。

【0023】以下、この出願の発明について実施の形態を詳しく説明する。

【0024】

【発明の実施の形態】第1発明は、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター核酸分子を、動物由来の細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団から、蛍光を発する細胞を分離することを特徴とする方法である。

【0025】細胞集団の細胞に導入するレポーター核酸分子は、ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーをコードするポリヌクレオチド配列と、このポリヌクレオチド配列の下流に、蛍光タンパク質をコードするポリヌクレオチドを連結した融合核酸分子である。

【0026】ドーパミン作動性ニューロンで発現する遺伝子のプロモーター／エンハンサーとしては、様々な動

物種のチロシンハイドロキシラーゼ（TH）遺伝子のプロモーター配列を使用することができるが、特にラットTH遺伝子のプロモーターが好ましい。このラットTH遺伝子プロモーター配列は、GenBank Accession No.AF069036として登録されており、この公知の配列に基づき合成したプローブを用いてラットゲノムライブラリーをスクリーニングする方法、または合成プライマーを用いたPCR法等により取得、利用することができる。

【0027】蛍光タンパク質としては、オワンクラゲ由来のグリーン蛍光タンパク質（GFP）、イソギンチャク由来のレッド蛍光タンパク質（RFP）等を利用することができるが、特にGFPあるいはGFP誘導体（例えば、Current Biology 6(2):178-182, 1996に記載の誘導体）の使用が好ましい。なお、GFPをコードするポリヌクレオチドとしては、そのcDNA（Gene 111(2):229-233, 1990: GenBank No. M62654）が知られている。また、EGFP cDNAのクローン（EGFP Poly(A): Clontech社製）を利用することもできる。

【0028】レポーター核酸分子を導入する細胞は、ヒトを含めた動物の脳由来の分化した神経系細胞を対象とすることができる。あるいは、ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する神経幹細胞、ES細胞、骨髄間質細胞等を試験管内で分化誘導したドーパミン作動性ニューロンを対象とすることもできる。これらの未分化な細胞からドーパミン作動性ニューロンを分化誘導するには、公知の方法（例えば、神経幹細胞：Nat. Neurosci. 1: 290-295, 1998、ES細胞：Nat. Biotechnol. 18: 675-679, 2000およびNeuron 28: 31-40, 2000）に従うことができる。

【0029】レポーター核酸分子を細胞に導入するには、このレポーター核酸分子を組み込んだ発現ベクターを個々の培養細胞に導入する方法を採用することができる。発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターを使用することができる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法を採用することができる。また、アデノウイルスベクター等のウイルスベクターを細胞に感染させる方法を利用することもできる。

【0030】あるいはまた、非ヒト動物を対象とする場合には、レポーター核酸分子を導入したトランスジェニック動物を作成することによって、細胞にレポーター核酸分子を導入するようにしてもよい。トランスジェニック動物は、公知の作成法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980）に従って作成することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、全ての体細胞にレポーター核酸分子を保有しているため、その中枢神経系組織を取り出し、蛍光シグナルを発する細胞を単離することによって、ドーパミン作動性ニューロンを大量に取得することができる。

【0031】前記の方法によってレポーター核酸分子を導入した細胞集団から、ドーパミン作動性ニューロンを濃縮・分離するには、蛍光顕微鏡によって培養細胞から蛍光シグナルを発する細胞を1個ずつ分離することも可能であるが、作業の大幅な効率化のためには、セルソーター（蛍光活性化セルソーター：FACS）を使用する方法が好ましい。このセルソーターによって、ドーパミン作動性ニューロンを自動的に濃縮・分離することが可能である。

【0032】第3発明の方法は、前記レポーター核酸分子を細胞集団の各細胞に導入し、この細胞集団の蛍光分布を測定することによって、細胞集団に存在するドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化、同定する方法である。材料や核酸分子導入方法は、基本的に第1発明と同一とすることができる。レポーター核酸分子を導入した細胞集団を顕微鏡で観察することにより、蛍光分布としてドーパミン作動性ニューロンを可視化、同定することができる。

【0033】第4発明の方法は、ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞にレポーター核酸分子を細胞に導入し、この細胞と候補物質とを共存させ、細胞の蛍光を指標として候補物質がドーパミン作動性ニューロン誘導因子か否かを決定するドーパミン作動性ニューロン誘導因子の同定方法である。ドーパミン作動性ニューロンへの分化能を有する細胞は、神経幹細胞、ES細胞、骨髄間質細胞等である。前記第1発明と同じレポーター核酸分子をこれらの未分化細胞に導入し、細胞の培地中に候補物質を添加する。候補物質が未分化細胞をドーパミン作動性ニューロンへと誘導するか否かは、前記第2発明の方法によって容易に確認することができる。

【0034】以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0035】

【実施例】実施例1

トランスジェニックマウス個体から、以下のとおりにドーパミン作動性ニューロンを濃縮・分離した。

【0036】ラットTH遺伝子のプロモーター配列の制御下でGFPを発現するベクター（RTH-GFP）を構築した。すなわち、ドーパミン作動性ニューロンで特異的に発現することが知られているラットTH遺伝子上流10 kbのプロモーター配列（Mol. Brain Res. 27:281-289, 1994; Mol. Cells 7:394-398, 1997）をEGFP cDNA（Clontech社製）の上流に挿入して導入ベクターを構築した。次に、この組換えベクターを開列して直鎖状とし、C57BL/6JマウスとDBA/2JマウスとのF1マウス由来の受精卵前核に注入した。遺伝子導入受精卵は常法に従って仮親の卵管に移植し、個体へと発生させ、TH-EGFPトランスジェニックマウスを作成した。

【0037】得られたTH-EGFPマウスの雄を野生型マウ

スと交配し、胎生12日目の胎仔の中脳腹側部を切り取り、この組織をトリプシン・EDTA溶液中で処理した後、ピペッティングにより細胞を分散させた。この細胞を24時間培養した後、抗TH抗体およびテキサスレッド標識2次抗体と反応させて解析した結果、GFP陽性抗体の約半分以上がTH陽性のドーパミン作動性ニューロンであることが確認された。

【0038】得られた細胞分散液にpropidium iodideを添加し、ナイロンメッシュをとおして未消化の組織片を除去した後、セルソーター（FACS Vantage：ベクトンディッキンソン社）を用いて解析した。その結果、図1に示したように、細胞分散液に含まれている細胞のうち7%の細胞が蛍光シグナルを示した。

【0039】次いで、propidium iodide陰性（生細胞）で、GFPの蛍光を発する細胞を試験管に集めた。集めた細胞をカバーガラスに接着させ、前記2と同様の方法により抗体との反応性を解析した。その結果、図2（B）に示したように、ほとんど全ての細胞がGFP陽性であり、その約60%がTH陽性（ドーパミン作動性ニューロン）であることが確認された。

実施例2

実施例1で得た細胞を、6-OHDAによって作製したパーキンソンモデルラットの線条体へ移植した。5週間後にアンフェタミン投与によって引き起こされる回転運動を解析したところ、全ての個体で有意な症状の改善が観察された。

実施例3

実施例1でトランスジェニックマウスの作成に用いたものと同様のTH-EGFP組換えベクターをトランスフェクション法によってマウスES細胞に導入し、導入遺伝子を有するES細胞株を樹立した。このES細胞株10,000個を、骨髄間質細胞株PA6が飽和状態で接着した直径3 cmの培養皿上で10% KSR、2 mM グルタミン、1 mM ビルビン酸、0.1 mM 非必須アミノ酸、および0.1 mM 2メルカプトエタノールを含むG-MEM培地を用いて37°Cで静置培養した。

【0040】TH-EGFPを導入したES細胞株は、未分化な状態ではEGFPを発現しないが、PA6との混合培養開始後4日目より、緑色蛍光を発する細胞が出現し、その数は次第に増加した。12日後にEGFP陽性細胞におけるTH、Huタンパク質、ドーパミンβヒドロキシラーゼのそれぞれの発現を間接蛍光抗体法によって調べた結果、EGFP陽性細胞（図3左）の大部分がTH陽性（図3右）、Huタンパク質陽性、ドーパミンβヒドロキシラーゼ陰性であることが確認された。

【0041】THはドーパミンだけではなく、ノルアドレナリンおよびアドレナリンの合成にも関与している。しかしながら、ドーパミンからノルアドレナリンおよびアドレナリンを合成するためにはドーパミンβヒドロキシラーゼが必要である。EGFP陽性細胞の大多数はTH陽性、ドーパミンβヒドロキシラーゼ陰性であり、さらにニュ

ーロン特異的マーカーであるHuタンパク質を発現していることから、これらの細胞はノルアドレナリン作動性ニューロンやアドレナリン作動性ニューロンではなく、ドーパミン作動性ニューロンであることが確認された。

【0042】以上の結果から、未分化なES細胞からドーパミン作動性ニューロンへと分化した細胞を確実に同定することが可能であることが確認された。また、このように同定されたドーパミン作動性ニューロンは、実施例1と同様のセルソーターを用いた方法によって分離することが可能である。

【0043】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、様々な種類の細胞によって構成される細胞集団からドーパミン作動性ニューロンを濃縮・分離する方法と、この方法によって高度に濃縮されたドーパミン作動性ニューロンが提供される。この細胞は、ヒトのパーキンソン病等の治療材料（移植用細胞）として有用であるばかりか、パーキンソン病の病因および病態解析、並びにその治療技術や治療薬等の開発に有用であ *

＊る。さらに、この出願の発明によって、ドーパミン作動性ニューロンを生きたまま可視化、同定する方法と、この方法を用いてドーパミン作動性ニューロン分化誘導因子を同定する方法が提供される。これらの方法によって、パーキンソン病等の移植用細胞を未分化細胞から効率よく取得することが可能となる。また、ドーパミン作動性ニューロン分化誘導因子は新たな治療薬の開発に有用である。

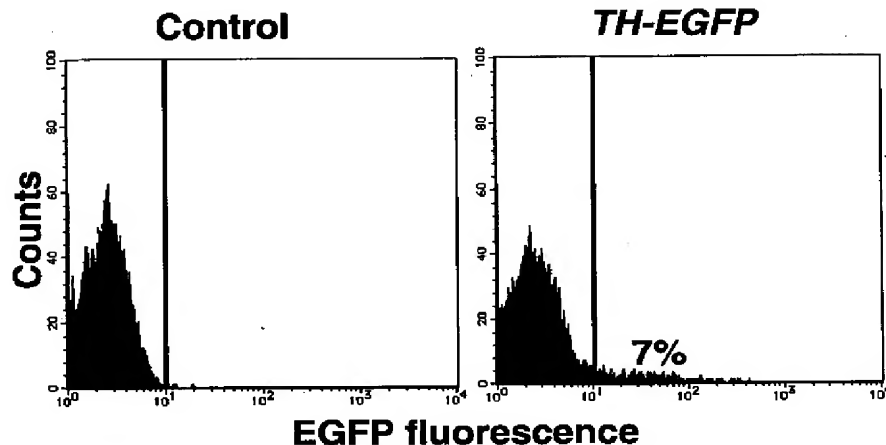
【図面の簡単な説明】

10 【図1】 TH-EGFPトランスジェニックマウスの胎仔中脳から得た細胞分散液のFACS解析の結果である。

【図2】細胞分散液の全細胞（A）およびFACSにより得た細胞（B）のそれぞれのGFP蛍光とTH遺伝子発現を解析した結果である。

【図3】 TH-EGFP遺伝子を導入したES細胞をPAC細胞と混合培養し、12日後に固定し、緑色蛍光を発する細胞を観察した結果（左）と、抗TH抗体を用いて染色した細胞を観察した結果である。

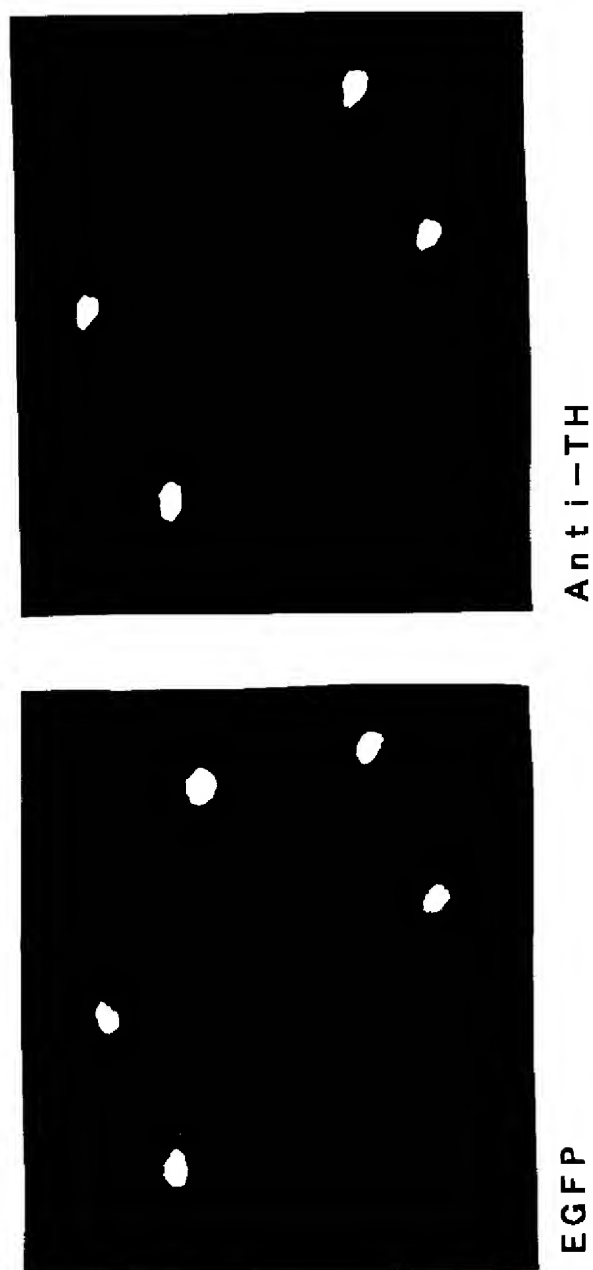
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/48
33/50
33/58

識別記号

F I

G 0 1 N 33/58
C 1 2 R 1:91)
C 1 2 N 15/00

テーマコード(参考)

A
A

//(C 1 2 N 5/10
C 1 2 R 1:91)

5/00
C 1 2 R 1:91)

B

(72)発明者 松下 夏樹
福島県福島市野田町6-10-30 サンテ・
ルミエル202号

Fターム(参考) 2G045 BA13 BB03 BB13 BB20 BB24
CB17 CB26 CB30 DA12 DA13
DA14 DA80 FA37 FB02 FB03
4B024 AA11 AA20 CA01 CA04 CA11
DA02 EA04 FA02 FA06 FA10
GA12 GA27 HA13
4B063 QA01 QA18 QQ08 QR32 QR35
QR60 QR77 QR80 QS03 QS05
QS36 QS38 QS39 QX02
4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 CE20
DA01 DA13
4B065 AA91X AA93X AB01 BA04
BA25 CA46 CA60

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-051775

(43)Date of publication of application : 19.02.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12N 5/10

C12P 21/02

C12Q 1/02

G01N 33/15

G01N 33/48

G01N 33/50

G01N 33/58

//(C12N 5/10

C12R 1:91)

(21)Application number : 2001-111210

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE &
TECHNOLOGY CORP

(22)Date of filing : 10.04.2001

(72)Inventor : OKANO YOSHIYUKI
SAWAMOTO KAZUNOBU
KOBAYASHI KAZUTO
MATSUSHITA NATSUKI

(30)Priority

Priority number : 2000165150

Priority date : 01.06.2000

Priority country : JP

(54) METHOD FOR CONCENTRATING AND SEPARATING DOPAMINERGIC NEURON

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for concentrating and separating dopaminergic neuron, by which the dopaminergic neuron can be concentrated and

separated from a cell group comprising various cells at a high rate.

SOLUTION: This method for concentrating and separating the dopaminergic neuron from the cell group, characterized by transducing reporter nucleic acid molecules expressing a fluorescent protein under the control of the promoter/ enhancer of a gene expressing the dopaminergic neuron into the cells of the cell group, respectively, and then separating fluorescent light-emitting cells from the cell group.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 25.10.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The concentration / separation approach of the dopaminergic neuron characterized by being the approach of separating a dopaminergic neuron, introducing into each cell of a cell population the reporter nucleic-acid molecule which discovers fluorescence protein under control of the promotor/enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron from a cell population, and separating the cell which emits fluorescence from this cell population.

[Claim 2] The approach of claim 1 that the gene discovered by the dopaminergic neuron is a tyrosin hydroxylase gene.

[Claim 3] The approach of claim 1 that fluorescence protein is Green fluorescence protein.

[Claim 4] The approach of claim 1 that each cell of a cell population is the brain origin.

[Claim 5] The approach of claim 1 that each cell of a cell population is the embryonic stem cell origin.

[Claim 6] The approach of claim 1 that each cell of a cell population is the bone marrow interstitial cell origin.

[Claim 7] The approach of claims 1, 4, 5, or 6 that each cell of a cell population is the Homo sapiens origin.

[Claim 8] One approach of claims 1-7 each cell of a cell population is a cell introduced in the recombination vector which holds a reporter nucleic-acid molecule.

[Claim 9] One approach of claims 1-6 each cell of a cell population is the animal to which the ontogeny of the totipotency cell of the nonhuman animal which introduced the reporter nucleic-acid molecule was carried out, or its descendant animal origin.

[Claim 10] One approach of claims 1-9 which do concentration and separation of the cell which emits fluorescence using a cell sorter.

[Claim 11] The cell which was condensed and separated by one approach of claims 1-10, and was held under the culture condition.

[Claim 12] The identification approach of the dopaminergic neuron characterized by being the approach of identifying living the dopaminergic neuron which exists in a cell population, introducing into each cell of a cell population the reporter nucleic-acid molecule which discovers fluorescence protein under control of the promotor/enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron, and measuring fluorescence

distribution of this cell population.

[Claim 13] The approach of claim 12 that the gene discovered by the dopaminergic neuron is a tyrosin hydroxylase gene.

[Claim 14] The approach of claim 12 that fluorescence protein is Green fluorescence protein.

[Claim 15] The approach of claim 12 that each cell of a cell population is the brain origin.

[Claim 16] The approach of claim 12 that each cell of a cell population is the embryonic stem cell origin.

[Claim 17] The approach of claim 12 that each cell of a cell population is the bone marrow interstitial cell origin.

[Claim 18] The approach of claims 12, 15, 16, or 17 that each cell of a cell population is the Homo sapiens origin.

[Claim 19] One approach of claims 12-18 each cell of a cell population is a cell introduced in the recombination vector which holds a reporter nucleic-acid molecule.

[Claim 20] One approach of claims 12-17 each cell of a cell population is the animal to which the ontogeny of the totipotency cell of the nonhuman animal which introduced the reporter nucleic-acid molecule was carried out, or its descendant animal origin.

[Claim 21] The identification approach of a dopaminergic neuron inducer that are the approach of identifying the factor which guides the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron to a dopaminergic neuron, introduce into a cell the reporter nucleic-acid molecule which discovers fluorescence protein under control of the promotor/enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron, make this cell and the candidate matter live together, and the candidate matter determines whether to be a dopaminergic neuron inducer by making the fluorescence of a cell into an index.

[Claim 22] The approach of claim 21 that the gene discovered by the dopaminergic neuron is a tyrosin hydroxylase gene.

[Claim 23] The approach of claim 21 that fluorescence protein is Green fluorescence protein.

[Claim 24] The approach of claim 21 that the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron is a neural stem cell.

[Claim 25] The approach of claim 21 that the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron is an embryonic stem cell.

[Claim 26] The approach of claim 21 that the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron is a bone marrow interstitial cell.

[Claim 27] The approach of claims 21, 24, 25, or 26 that the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron is the Homo sapiens origin.

[Claim 28] One approach of claims 21-27 the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron is a cell introduced in the recombination vector which holds a reporter nucleic-acid molecule.

[Claim 29] One approach of claims 21-26 the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron is the animal to which the ontogeny of the totipotency cell of the nonhuman animal which introduced the reporter nucleic-acid molecule was carried out, or its descendant animal origin.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] Invention of this application relates to the concentration / separation approach of a dopaminergic neuron. In more detail, a dopaminergic neuron useful as the transplantation cell for therapies, such as Parkinson's disease, and a research ingredient for cure development of these diseases is identified, and it is related with the approach of condensing certainly efficiently and separating.

[0002]

[Description of the Prior Art] Parkinson's disease is a disease whose symptoms are shown when the dopaminergic neuron of midbrain substantia nigra carries out denaturation omission selectively. The effectiveness of transplanting the fetus-mesencephalon tissue which contains in the therapy many dopaminergic neurons (or cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron) in a patient's brain (striatum) is proved.

[0003] However, it is impossible to secure the embryo brain tissue of sufficient amount for the usual clinical activity in practice. For this reason, the donor cell replaced with fetus mesencephalon is called for.

[0004] for example, many undifferentiated nervous systems -- using the cell which specialized from the cell to the dopaminergic neuron as a donor cell for transplantation is examined. furthermore, an embryonic stem cell, a bone marrow interstitial cell, etc. -- un--- a nervous system -- using the cell made to specialize from a cell to a dopaminergic neuron as a donor cell for transplantation is also examined. Since differentiation inducing of these cells can be carried out after making it increase within a test tube, it can become a means to solve the problem in short of a donor. Furthermore, since a bone marrow interstitial cell can be safely extracted from an adult, it can prepare the dopaminergic neuron for transplantation from a patient's own cell. Therefore, if such a therapy approach is realized, technical problems, such as a problem in short of a donor and rejection, are not only solved, but the ethical problem by obtaining a dopaminergic neuron from an abortion embryo will be solved.

[0005] However, the approach in which a dopaminergic neuron is made to specialize efficiently from an undifferentiated cell population is not fully established. Moreover, from an undifferentiated cell population, various cells other than a dopaminergic neuron

specialize. Furthermore, the danger that the cell which forms a neoplasm after transplantation is contained is in an undifferentiated cell population. Therefore, in order to use for transplantation the dopaminergic neuron made to specialize within a test tube, it is necessary to separate a dopaminergic neuron from the cell population of varieties selectively.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] As for the condensed dopaminergic neuron, the usefulness as a transplantation donor cell for a therapy of Parkinson's disease etc. is expected as aforementioned. Moreover, it is very useful to condense and separate a dopaminergic neuron also to identification of the new protein and the gene which are specifically discovered by this neurone. These protein and its gene are because a new remedy is expected.

[0007] Moreover, it is very important to identify the factor in which a dopaminergic neuron is made to specialize within a test tube from an undifferentiated cell. Such a factor is because it is not only useful in order to guide a dopaminergic neuron efficiently from an undifferentiated cell, but ** from which the factor itself can serve as a new remedy is expected.

[0008] However, the method of separating a dopaminergic neuron from the cell population under a body tissue or a culture condition is not yet established. Furthermore, the approach of visualizing living a dopaminergic neuron required for such retrieval is not yet established not to mention the approach of searching for the factor which guides a dopaminergic neuron within a test tube, either.

[0009] Invention of this application makes it the technical problem to visualize living the dopaminergic neuron in the cell population constituted by various cells, to condense that dopaminergic neuron at a high rate, and to offer the approach of separating.

[0010] Moreover, invention of this application also makes it the technical problem to offer the dopaminergic neuron separated by that approach. Furthermore, invention of this application requires also as a technical problem offering the approach of specifying the factor which carries out differentiation inducing of the undifferentiated cell to a dopaminergic neuron.

[0011]

[Means for Solving the Problem] This application is the approach of separating a dopaminergic neuron from a cell population as the 1st invention, introduces into each cell of a cell population the reporter nucleic-acid molecule which discovers fluorescence protein under control of the promotor/enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron, and offers the concentration / separation approach of the dopaminergic neuron characterized by separating the cell which emits fluorescence from this cell population.

[0012] As the 2nd invention, it condenses and dissociates by the approach of said 1st invention, and this application offers the cell held under the culture condition again. Moreover, this application is the approach of visualizing and identifying the dopaminergic neuron which exists in a cell population as the 3rd invention, living, introduces into each cell of a cell population the reporter nucleic-acid molecule which discovers fluorescence protein under control of the promotor/enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron, and offers the identification approach of the dopaminergic neuron

characterized by measuring fluorescence distribution of this cell population.

[0013] Furthermore, this application is the approach of identifying the factor which guides the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron to a dopaminergic neuron as the 4th invention. The reporter nucleic-acid molecule which discovers fluorescence protein under control of the promotor/enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron is introduced into a cell. This cell and the candidate matter are made to live together, and the identification approach of a dopaminergic neuron inducer that the candidate matter determines whether to be a dopaminergic neuron inducer by making the fluorescence of a cell into an index is offered.

[0014] The following is made into the desirable mode in said each 1st and 3rd invention approaches. The gene discovered by the dopaminergic neuron should be a tyrosin hydroxylase gene.

[0015] Fluorescence protein should be Green fluorescence protein. Each cell of a cell population should be the brain origin. Each cell of a cell population should be an embryonic stem cell.

[0016] Each cell of a cell population should be the bone marrow interstitial cell origin. Each cell of a cell population should be the Homo sapiens origin. It is the cell introduced in the recombination vector to which each cell of a cell population holds a reporter nucleic-acid molecule.

[0017] It is the animal to which the cell population carried out the ontogeny of the totipotency cell of the nonhuman animal which introduced the reporter nucleic-acid molecule, or its descendant animal origin. Moreover, in said 1st invention, it is making concentration and to dissociate into the desirable mode for the cell which emits fluorescence using the cell sorter.

[0018] Furthermore, the following is made into the desirable mode in said 3rd invention. The gene discovered by the dopaminergic neuron should be a tyrosin hydroxylase gene.

[0019] Fluorescence protein should be Green fluorescence protein. The cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron should be a neural stem cell.

[0020] The cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron should be an embryonic stem cell. The cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron should be a bone marrow interstitial cell.

[0021] The cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron should be the Homo sapiens origin. It is the cell introduced in the recombination vector to which the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron holds a reporter nucleic-acid molecule.

[0022] It is the animal to which the ontogeny of the totipotency cell of the nonhuman animal into which the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron introduced the reporter nucleic-acid molecule was carried out, or its descendant animal origin.

[0023] Hereafter, the gestalt of operation is explained in detail about invention of this application.

[0024]

[Embodiment of the Invention] The 1st invention is an approach characterized by introducing into each cell of the cell population of the animal origin the reporter nucleic-acid molecule which discovers fluorescence protein under control of the

promotor/enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron, and separating the cell which emits fluorescence from this cell population.

[0025] The reporter nucleic-acid molecule introduced into the cell of a cell population is a synkaryon acid-content child who connected the polynucleotide which carries out the code of the fluorescence protein with the lower stream of a river of the polynucleotide array which carries out the code of the promotor/the enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron, and this polynucleotide array.

[0026] Although the promotor array of the thyrosin hydroxylase (TH) gene of various animal species can be used as the promotor/an enhancer of the gene discovered by the dopaminergic neuron, the promotor of a rat TH gene is especially desirable. This rat TH gene promotor array is registered as GenBank Accession No.AF069036, and can be acquired and used by the approach of screening a rat genomic library using the probe compounded based on this well-known array, or the PCR method using a synthetic primer.

[0027] As fluorescence protein, although the Green fluorescence protein (GFP) of the OWAN jellyfish origin, the red fluorescence protein (RFP) of the sea anemone origin, etc. can be used, the activity of GFP or a GFP derivative (for example, Current Biology 6(2):178- derivative given in 182 and 1996) is especially desirable. In addition, as a polynucleotide which carries out the code of the GFP, the cDNA (Gene 111(2):229-233, 1990:GenBank No.M62654) is known. Moreover, the clone (product made from EGFP Poly(A):Clontech) of EGFP cDNA can also be used.

[0028] the nervous system in which the brain origin of the animal in which the cell which introduces a reporter nucleic-acid molecule included Homo sapiens specialized -- it can be aimed at a cell. Or it can also be aimed at the dopaminergic neuron which carried out differentiation inducing of the neural stem cell and embryonic stem cell which have the differentiation potency to a dopaminergic neuron, the bone marrow interstitial cell, etc. within the test tube. In order to carry out differentiation inducing of the dopaminergic neuron from these undifferentiated cells, a well-known approach (for example, neural stem cell:Nat.Neurosci.1:290-295, 1998, embryonic stem cell:Nat.Biotechnol.18:675-679, 2000 and Neuron 28:31-40, 2000) can be followed.

[0029] In order to introduce a reporter nucleic-acid molecule into a cell, the approach of introducing the expression vector incorporating this reporter nucleic-acid molecule into each cultured cell is employable. As an expression vector, the plasmid vector for an animal cell manifestation can be used. In order to introduce such a plasmid vector into a cell, the electric terebration, a calcium phosphate method, the liposome method, and the DEAE dextran method are employable. Moreover, the approach of infecting virus vectors, such as an adenovirus vector, with a cell can also be used.

[0030] Or when aimed at a nonhuman animal, you may make it introduce a reporter nucleic-acid molecule into a cell again by creating the transgenic animal which introduced the reporter nucleic-acid molecule. A transgenic animal can be created according to the well-known creating method (for example, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:7380-7384, 1980). Since such a transgenic nonhuman animal holds the reporter nucleic-acid molecule in all somatic cells, it can acquire a dopaminergic neuron to a large quantity by isolating the cell which emits ejection and a fluorescence signal for the central nervous system organization.

[0031] Although it is also possible each to separate one cell which emits a fluorescence signal from a cultured cell with a fluorescence microscope in order to condense and separate a dopaminergic neuron from the cell population which introduced the reporter nucleic-acid molecule by the aforementioned approach, for the large increase in efficiency of an activity, the approach of using a cell sorter (fluorescence activated cell sorter: FACS) is desirable. It is possible to condense and separate a dopaminergic neuron automatically by this cell sorter.

[0032] The approach of the 3rd invention is an approach of visualizing and identifying the dopaminergic neuron which exists in a cell population, living, by introducing said reporter nucleic-acid molecule into each cell of a cell population, and measuring fluorescence distribution of this cell population. An ingredient and the nucleic-acid molecule installation approach can be fundamentally made the same as that of the 1st invention. By observing under a microscope the cell population which introduced the reporter acetic-acid molecule, a dopaminergic neuron can be visualized and identified as fluorescence distribution.

[0033] The approach of the 4th invention is the identification approach of a dopaminergic neuron inducer that introduce a reporter nucleic-acid molecule into the cell which has the differentiation potency to a dopaminergic neuron at a cell, make this cell and the candidate matter live together, and the candidate matter determines whether to be a dopaminergic neuron inducer by making the fluorescence of a cell into an index. The cells which have the differentiation potency to a dopaminergic neuron are a neural stem cell, an embryonic stem cell, a bone marrow interstitial cell, etc. The same reporter nucleic-acid molecule as said 1st invention is introduced into these undifferentiated cells, and the candidate matter is added in the culture medium of a cell. It can check easily whether the candidate matter guides an undifferentiated cell to a dopaminergic neuron by the approach of said 2nd invention.

[0034] Hereafter, an example is shown, and about invention of this application, further, although explained concretely, invention of this application is not a detail and the thing limited by the following examples.

[0035]

[Example] The dopaminergic neuron was condensed and separated from the example 1 transgenic-mouse individual as follows.

[0036] The vector (RTH-GFP) which discovers GFP under control of the promotor array of a rat TH gene was built. That is, the promotor array (Mol.BrainRes.27:281-289, 1994; Mol.Cells 7:394-398, 1997) of rat TH gene upstream 10 kb by which it is known that it will be specifically discovered by the dopaminergic neuron was inserted in the upstream of EGFP cDNA (product made from Clontech), and the introductory vector was built. Next, this recombination vector was ****(ed), and it considered as the shape of a straight chain, and poured into the fertilized egg pronucleus of F1 mouse origin of C57BL/6J mouse and DBA/2J mouse. According to the conventional method, you transplanted the transgenics fertilized egg to the oviduct of assumed parents, it made it generate to an individual, and created the TH-EGFP transgenic mouse.

[0037] After crossing the male of the obtained TH-EGFP mouse with a wild type mouse, cutting off the midbrain antinode flank of a day [of viviparity / 12nd] fetus and processing this organization in a trypsin and an EDTA solution, the cell was distributed by

pipetting. After cultivating this cell for 24 hours, as a result of making it react with anti-TH antibody and the secondary Texas red indicator antibody and analyzing, it was checked that more than abbreviation one half of a GFP positivity antibody is the dopaminergic neuron of TH positivity.

[0038] After adding propidium iodide to the obtained cell dispersion liquid and removing an undigested explant through a nylon mesh, it analyzed using the cell sorter (FACS Vantage: BEKUTONDIKINSON). Consequently, as shown in drawing 1 , 7% of cell showed the fluorescence signal among the cells contained in cell dispersion liquid.

[0039] Subsequently, the cell which emits the fluorescence of GFP was brought together in the test tube by the propidium iodide negative (viable cell). The collected cells were pasted up on the cover glass and reactivity with an antibody was analyzed by the same approach as said 2. Consequently, as shown in drawing 2 (B), it was checked that almost all cells are GFP positivities and the about 60% is TH positivity (dopaminergic neuron). The cell obtained in the example 2 example 1 was transplanted to the striatum of the PAKINSON model rat produced by 6-OHDA. When rotation caused by amphetamine administration after five weeks was analyzed, the improvement of a significant symptom was observed by all individuals.

The same TH-EGFP recombination vector as what was used for creation of a transgenic mouse in the example 3 example 1 was introduced into the mouse embryonic stem cell by the transfection method, and the embryonic stem cell stock which has an introductory gene was established. They are KSR and 2 mM 10% on the culture plate of diameter 3 cm on which the bone marrow stromata cell strain PA 6 pasted up these 10,000 embryonic stem cell stocks by the saturation state. A glutamine, 1 mM pyruvic acid, and 0.1 mM Nonessential amino acid and 0.1 mM Stationary culture was carried out at 37 degrees C using the G-MEM culture medium containing 2-mercaptoethanol.

[0040] Although the embryonic stem cell stock which introduced TH-EGFP did not discover EGFP in the undifferentiated condition, after mixed culture initiation with PA6, the cell which emits green fluorescence appeared and the number increased gradually from the 4th day. As a result of investigating each manifestation of TH in an EGFP positivity cell, Hu protein, and dopamine beta-hydroxylase with an indirect fluorescent antibody technique 12 days after, it was checked that most EGFP positivity cells (drawing 3 left) are TH positivity (drawing 3 right), Hu protein positivity, and dopamine-beta-hydroxylase negative.

[0041] TH is participating not only in dopamine but in composition of a noradrenalin and adrenaline. However, in order to compound a noradrenalin and adrenaline from dopamine, dopamine beta-hydroxylase is required. The generalities of an EGFP positivity cell were TH positivity and dopamine-beta-hydroxylase negative, and since Hu protein which is a neurone specific marker further was discovered, it was checked that these cells are noradrenergic neurone or not adrenergic neurone but dopaminergic neurons.

[0042] It was checked that it is possible to identify certainly the cell which specialized from the undifferentiated embryonic stem cell to the dopaminergic neuron from the above result. Moreover, the dopaminergic neuron identified in this way can be dissociated by the approach using the same cell sorter as an example 1.

[0043]

[Effect of the Invention] The dopaminergic neuron condensed by altitude by the approach

invention of this application condenses and separates a dopaminergic neuron from the cell population constituted by the cell of various classes, and this approach is offered as explained in detail above. This cell is useful to development of that treatment technique, remedy, etc. in the cause of a disease of about [being useful as therapy ingredients (cell for transplantation) such as human Parkinson's disease,] and Parkinson's disease and symptoms analysis, and a list. Furthermore, the approach of visualizing and identifying by invention of this application, living a dopaminergic neuron and the method of identifying a dopaminergic neuron differentiation inducing factor using this approach are offered. These approaches enable it to acquire cells for transplantation, such as Parkinson's disease, from an undifferentiated cell efficiently. Moreover, the dopaminergic neuron differentiation inducing factor is useful to development of a new remedy.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is as a result of the FACS analysis of the cell dispersion liquid obtained from the fetus midbrain of a TH-EGFP transgenic mouse.

[Drawing 2] It is the result of analyzing each GFP fluorescence and TH gene expression of the cell (B) obtained by all the cells (A) and FACS of cell dispersion liquid.

[Drawing 3] They are the result (left) of having observed the cell which carries out the mixed culture of the embryonic stem cell which introduced the TH-EGFP gene to PA6 cell, is fixed 12 days after, and emits green fluorescence, and the result of observing the cell dyed using anti-TH antibody.

[Translation done.]